

การศึกษาปัญหา เฮโมราจิกเซฟติซีเมีย ในปลาน้ำจืด

ทวีวัฒน์ ดีมะการ* นพพร ไต้ะมี

สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์ เกษตรกลาง จตุจักร กรุงเทพมหานคร 10900

*ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์: 0-2579-8908 โทรสาร: 0-2579-8918 E-mail: taweewat.d@dld.go.th

บทคัดย่อ

เฮโมราจิกเซฟติซีเมีย (hemorrhagic septicemia, HS) ในปลา คือ การพบจุดเลือดออกและแผลหลุมตามลำตัวหรืออวัยวะภายในที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ซึ่งอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย (bacterial hemorrhagic septicemia, BHS) หรือเชื้อไวรัส (viral hemorrhagic septicemia, VHS) นอกจากนี้การติดเชื้อปรสิตภายนอกอาจทำให้ผิวหนังของปลาเกิดแผลจนเกิดการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัสที่ก่อโรค BHS หรือ VHS แทรกซ้อนได้ HS เป็นอีกโรคหนึ่งที่พบมากในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลาทั่วโลก เนื่องจากมีอัตราการตายสูง ทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัญหาของการเกิด HS ในปลาน้ำจืดที่ส่งมาตรวจวินิจฉัยโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติระหว่างปี พ.ศ. 2547-2554 ผลการศึกษสาเหตุของ HS พบว่าเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรีย 61.35% (454/740) และเกิดจากการติดเชื้อไวรัส 40.60% (108/266) เชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบมี 9 ชนิด ได้แก่ *Aeromonas hydrophilla*, *Aeromonas sobria*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella putrefaciens*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholera* และ *Vibrio fluviani* ส่วนเชื้อไวรัสที่ตรวจพบมีเพียงชนิดเดียว คือ koi herpes virus ในขณะที่เชื้อปรสิตที่ตรวจพบมี 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม Monogenea ได้แก่ *Dactylogyrus* spp. และกลุ่ม Protozoa ได้แก่ *Epistylis* spp., *Oodinium* spp. และ *Trichodina* spp. ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด พบว่า amoxicillin, gentamicin, ofloxacin และ sulfamethoxazole/trimethoprim ยังคงสามารถใช้รักษาโรค BHS ได้ แต่ควรใช้เท่าที่จำเป็นภายใต้การควบคุมดูแลของสัตวแพทย์เท่านั้น และหยุดใช้ยาในระยะเวลาที่เหมาะสมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต เพื่อไม่ให้เกิดการดื้อยา และการตกค้างของยาในปลาซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

คำสำคัญ : เฮโมราจิกเซฟติซีเมีย, ปลาน้ำจืด, ความไวต่อยาต้านจุลชีพ

บทนำ

เฮโมราจิกเซปติซีเมีย (hemorrhagic septicemia, HS) ในปลา คือ การพบจุดเลือดออกและแผลหลุมตามลำตัวหรืออวัยวะภายในที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เป็นอีกโรคหนึ่งที่พบมากในอุตสาหกรรมเลี้ยงปลาทั่วโลก เนื่องจากมีอัตราการตายสูง จึงทำให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก โรค HS ที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียเรียกว่า bacterial hemorrhagic septicemia (BHS) ส่วนการติดเชื้อไวรัสเรียกว่า viral hemorrhagic septicemia (VHS) อาจเกิดจากการติดเชื้อชนิดเดียวหรือ หลายชนิดร่วมกัน พบทั้งในปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม ที่เป็นปลารวมชาติหรือปลาเลี้ยง (Conroy and Conroy, 2006; Bowser, 2009) นอกจากนี้การติดเชื้อปรสิตภายนอกซึ่งไม่ใช่สาเหตุหลักของโรค HS ส่วนใหญ่ทำให้ปลามีแผลที่ผิวหนัง อ่อนแอ และมีอัตราการตายต่ำ (ชาญณรงค์, 2550) อย่างไรก็ตามหากมีการติดเชื้อแบคทีเรียและ/หรือไวรัสแทรกซ้อน อาจทำให้อาการของโรครุนแรงจนปลาตายได้ (สมเกียรติ, 2552) สาเหตุของ BHS อาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิดใดชนิดหนึ่งหรือร่วมกันหลายชนิด ได้แก่ *Aeromonas* spp., *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium* spp., *Pasteurella multocida*, *Plesiomonas shigelloides*, *Pseudomonas* spp. และ *Vibrio* spp. จากรายงานในต่างประเทศพบว่ามีอัตราการตายตั้งแต่ 5 ถึง 100% ในฟาร์มปลานิลทั้งที่เลี้ยงในน้ำจืดและน้ำกร่อย (Sarig and Bejerano, 1980) ส่วนในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการศึกษา BHS อย่างเป็นทางการ แต่มีรายงานของสมโภชน์และคณะ (2546) ที่พบว่าปลามีอัตราการตายอย่างผิดปกติ 30-50% และประพันธ์ศักดิ์และนนทวิทย์ (2552) ที่พบว่าอัตราการตายสูงถึง 85-90% ภายใน 5-7 วันหลังจากแสดงอาการ อาการของโรค BHS ที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่ามีแตกต่างกันไป เช่น ในปลานิลลำตัวจะมีสีดำ ชีม ขาดออกซิเจน ตาข้างหนึ่งหรือทั้งสองข้างบวมโป่ง มีแผลหลุมหรือเนื่อตายขนาดต่างๆ มีจุดเลือดออกบริเวณโคนครีบอก โคนหาง และในบริเวณลูกตา อาจพบจุดเลือดออกและเนื่อตายในอวัยวะภายใน เช่น หัวใจ ตับ ไต ม้าม กล้ามเนื้อ ฤงลม และช่องท้อง หรือถ้าเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Streptococcus agalactiae* และ *Streptococcus iniae* อาจพบความผิดปกติภายในช่องท้อง เช่น มีน้ำสีเหลือง ฤงน้ำดีและม้ามบวมโต และอาจพบการบวมเนื่อที่ลำไส้ร่วมด้วย (Camus et al., 1998; Chinabut et al., 2012; Conroy and Conroy, 2008)

สำหรับเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดโรค VHS ได้แก่ koi herpes virus (KHV), spring viraemia of carp virus (SVCV) และ viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) ทำให้ปลามีจุดเลือดออกบริเวณลำตัวและด้านท้องได้เช่นเดียวกัน ซึ่งการติดเชื้อ KHV และ SVCV พบได้ทั่วไปในปลาตระกูลปลาแคร์ป ปลาไน และปลาบางชนิดในตระกูล Cyprinid และ Ictalurid เนื่องจาก VHS ที่เกิดจากเชื้อ KHV มีการระบาดมากในประเทศญี่ปุ่น และ VHS ที่เกิดจากเชื้อ SVCV มีการระบาดได้ทั่วไป (OIE, 2012; Srisuvan et al., 2010a) ดังนั้นกรมประมงจึงทำการเฝ้าระวังเชื้อไวรัสทั้งสองชนิดนี้เป็นหลักจากการนำเข้าปลาในตระกูลดังกล่าว (กรมประมง, 2546, 2547) สำหรับการติดเชื้อ VHSV อาจพบเพียงแผลตื้น หรือไม่พบรอย

โรคที่ผิวหนัง แต่มีอาการทางระบบประสาทร่วมด้วย โรคนี้พบได้ในปลาหลายสายพันธุ์ทั้งในยุโรปและอเมริกา ส่วนในเอเชียมีรายงานว่าพบในปลาสายพันธุ์ Japanese flounder ของประเทศญี่ปุ่นเท่านั้น (OIE, 2009) นอกจากนี้เชื้อไวรัสทั้งสามชนิดสามารถก่อโรคและทำให้มีอัตราการตายสูงในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 3-12°C (นันทริกา, 2549; นันทริกา และจิรศักดิ์, 2548; สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด, 2549; สุรัชย์ และคณะ, 2550; Bowser, 2009; CFSPH, 2007; OIE, 2012; Rolland and Egrie, 2006) จากที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้วิจัยเห็นว่าปัญหาของการเกิดโรค HS ในปลาน้ำจืดยังคงเป็นปัญหาที่สำคัญ อีกทั้งยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาปัญหาของการเกิดโรค HS ในปลาน้ำจืดของประเทศไทยมาก่อน ดังนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการรักษา ควบคุม ป้องกัน ลดปัญหาการติดยาของเชื้อ และลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจที่อาจเกิดขึ้นได้

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ตัวอย่างปลาน้ำจืด

ตัวอย่างปลาน้ำจืดที่ส่งมาตรวจวินิจฉัยโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติระหว่างปี พ.ศ. 2547-2554 จากผู้เลี้ยง 267 ราย จำนวน 997 ตัว ประกอบด้วย ปลานิล 389 ตัว ปลาแคร์ป 266 ตัว และปลาอื่นๆ 342 ตัว ได้แก่ ปลาสวายงาม และปลาเบญจพรรณ (ดุก ช่อน สวาย แรด ตะเพียน) บันทึกอาการทางคลินิก จากนั้นทำการสลับปลาด้วยน้ำมันกานพลูในขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตร หรือแช่ในน้ำแข็ง ส่งตรวจวินิจฉัยหาสาเหตุของโรคทางพยาธิวิทยา พิษวิทยา ปรสิติวิทยา ไวรัสวิทยา และแบคทีเรียวิทยาตามกลุ่มอาการ

2. การตรวจทางพยาธิวิทยา

ตรวจหารอยโรคด้วยตาเปล่าในตัวอย่างปลาจำนวน 997 ตัว ตรวจทางจุลพยาธิวิทยาในปลาที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรค HS จำนวน 317 ตัว โดยทำการผ่าซากปลาขนาดใหญ่และตัดเก็บแผลบริเวณผิวหนังและกล้ามเนื้อ เหงือก ตับ ไต หัวใจ และสมอง ให้ชิ้นเนื้อหนาไม่เกิน 3 มิลลิเมตร ส่วนในปลาขนาดเล็ก (smaller) หรือปลาน้ำจืดนิ้วมือ (fingerlings) ทำการตัดแผ่นปิดเหงือก ตัดตามเส้นกลางตัว และแยกอวัยวะภายในออก ในลูกปลาน้ำจืด (fry) ทำการแช่ในน้ำยา 10% buffered formalin ทั้งตัว (Mumford et al., 2007) จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐานทางจุลพยาธิวิทยา (Sheehan and Hrapchak, 1980) เพื่อทำเป็นบล็อกเนื้อเยื่อ และตัดเป็นแผ่นขนาด 3-4 ไมครอน ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อแล้วย้อมสี Haematoxylin and Eosin (H&E) และนำมาดูรอยโรคด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ยี่ห้อ Olympus (Optical Co., Ltd., Japan)

3. การตรวจทางพิษวิทยา

ตรวจทางพิษวิทยาในตัวอย่างปลาจำนวน 231 ตัว โดยเก็บ เนื้อปลา ตับ ไต กระเพาะ และลำไส้ ตรวจหาสารตะกั่วโดยสกัดตัวอย่างตามวิธีของ Stahr (1991) กล่าวโดยย่อดังนี้ บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ลงในถ้วย crucible เติมสารละลาย 0.2% magnesium acetate

tetrahydrate 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปประเหียบบนเตาให้ความร้อนจนแห้ง จากนั้นนำไปเผาที่อุณหภูมิ 650°C เป็นเวลา 4-6 ชั่วโมง นำตัวอย่างออกจากเตาเผาตั้งทิ้งไว้ให้เย็น แล้วละลายด้วย 2 N hydrochloric acid กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง แล้วนำไปวัดหาปริมาณสารตะกั่ว ด้วยเครื่อง Atomic absorption spectrophotometer (Shimadzu, Japan) โดยเทียบกับกราฟของสารละลายมาตรฐานตะกั่วที่ทราบค่า และตรวจหายาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมต (carbamate) และออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) โดยสกัดตัวอย่างตามวิธีที่ดัดแปลงจากวิธีของ Sasaki et al. (1987) และ Sato and Ishikura (1987) กล่าวโดยย่อดังนี้ บดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วชั่งตัวอย่าง 20 กรัม ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 500 มิลลิลิตร เติมน้ำ acetone 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วย wrist action shaker ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยระบบสุญญากาศ สกัดด้วย methylene chloride กำจัดสารปนเปื้อนด้วย florisil column ชะด้วย hexane:acetone ในอัตราส่วน 95:5 และ 75:5 อย่างละ 100 มิลลิลิตร นำสารที่ได้มาระเหยแห้งและปรับปริมาตรด้วย acetone pesticide grade 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หา ยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตและกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ด้วยเทคนิค Gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS) และ Thin layer chromatography (TLC)

4. การตรวจทางปรสิตวิทยา

ตรวจทางปรสิตวิทยาในตัวอย่างปลาจำนวน 559 ตัว ด้วยการตัดเก็บเหงือก โดยเปิดส่วนแผ่นปิดเหงือก (operculum) ของปลา แล้วใช้กรรไกรตัดที่ส่วนปลายของซี่เหงือก (primary lamella) มาวางบนสไลด์ที่มีหยดน้ำเกลือ (normal saline) แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นทำการขูดผิวหนัง (skin scraping) โดยการใช้กระจกปิดสไลด์ขูดที่ผิวหนังตัวปลา ตลอดความยาวลำตัว ตั้งแต่หลังครีบอกจนถึงปลายหาง แล้วนำมาป้ายบนสไลด์ที่มีหยดน้ำเกลือ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (Noga, 2000) นำตัวอย่างที่ได้มาทำการตรวจแยกชนิดปรสิตภายนอกที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ยี่ห้อ Olympus (Optical Co., Ltd., Japan) ที่กำลังขยาย 100 และ 200 เท่า โดยใช้หลักเกณฑ์ในการจำแนกชนิดของปรสิตที่ตรวจพบจากรูปภายนอก (กมลพร และสุปราณี, 2526; ปภาศิริ, 2538; ประไพศิริ, 2546; Klinger and Floyd, 2009; Komalamisra, 1983; Noga, 2000)

5. การตรวจทางไวรัสวิทยา

ตรวจทางไวรัสวิทยาในตัวอย่างปลาจำนวน 266 ตัว โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเหงือกด้วยวิธีปราศจากเชื้อตัวอย่างละไม่น้อยกว่า 10 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดเก็บตัวอย่างที่ผ่านการฆ่าเชื้อและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการสกัดสารพันธุกรรม หรือในกรณีที่ทำการสกัดสารพันธุกรรมทันที ให้เก็บรักษาตัวอย่างไว้ในที่แห้งอุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการสกัด DNA โดยใช้ชุดตรวจเชื้อ KHV สำเร็จรูป IQ2000™ KHV Detection and Prevention System (GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan) และทำการสกัด RNA โดยใช้ชุดตรวจเชื้อ SVCV สำเร็จรูป IQ2000™ SVCV Detection and Prevention System (GeneReach Biotechnology Corp., Taiwan) นำ DNA และ RNA template ที่ได้มาทำปฏิกิริยา Nested Polymerase Chain Reaction (Nested PCR) โดยใช้ชุดตรวจหาเชื้อสำเร็จรูปข้างต้น ใช้ PCR

condition การเตรียม agarose gel การทำ electrophoresis และการย้อมสี ethidium bromide ตามวิธีของผู้ผลิต โดยใช้เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมยี่ห้อ Biometra[®] รุ่น TGradient thermocycler (Biometra, Germany) จากนั้นอ่านผลโดยการตรวจหาแถบของ PCR product ภายใต้แสง UV เปรียบเทียบกับตัวควบคุมบวกและลบ

6. การตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

ตรวจทางแบคทีเรียวิทยาในตัวอย่างปลาจำนวน 740 ตัว โดยตัดเก็บเหงือก และชิ้นเนื้อตายบริเวณผิวหนัง ตรวจเนื้อเยื่อสดด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง ที่กำลังขยาย 400 เท่า เพื่อดูลักษณะของ haystack ซึ่งเป็นลักษณะของการจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนคล้ายกองฟางของเชื้อ *Flavobacterium columnare* ที่เป็นสาเหตุของการเกิดรอยโรค saddleback lesion (รูปที่ 1) ของโรค Columnaris disease (Conroy and Conroy, 2008) จากนั้นทำการเปิดผ่าซากโดยหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจากเชื้อภายนอกลำตัว และภายในลำไส้ (Bondad-Reantaso et al., 2001) ใช้ลูปปลอดเชื้อเขี่ยโดยตรงที่อวัยวะภายใน นำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด 7% defibrinated sheep blood agar (SBA) และ MacConkey agar (MC) เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียทั่วไป และอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Anacker and Ordal ทั้งชนิดเหลว (Anacker and Ordal Broth; AOB) และชนิดแข็ง (Anacker and Ordal Agar; AOA) เพื่อแยกเชื้อ *F. columnare* (Anacker and Ordal, 1955) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง ยกเว้น AOB และ AOA สังเกตลักษณะของเชื้อที่ขึ้นทุก 24 ชั่วโมง นาน 5 วัน ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ ยี่ห้อ Olympus (Optical Co., Ltd., Japan) (Bernardet, 1989; Kubilay et al., 2008; Pilarski et al., 2008) จากนั้นจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ ตามวิธีของ Forbes et al. (2007) และทดสอบด้วยชุดทดสอบ API[®] strips ได้แก่ API strep, API 20E หรือ API 20NE (bioMerieux, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 30°C นาน 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อแบคทีเรียทั่วไป และ 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *F. columnare* แล้วเติม reagent ชนิดต่างๆ ตามที่บริษัทผู้ผลิตชุดทดสอบกำหนด สังเกตการเปลี่ยนสี บันทึกผล แล้วแปลผลผ่านเว็บไซต์ของบริษัทผู้ผลิต จากนั้นทำการทดสอบความไวของเชื้อต่อยาต้านจุลชีพ ตามวิธีมาตรฐานจาก Clinical Laboratory Standards Institute; CLSI (Wikler et al., 2006) โดยใช้แผ่นยา (OXOID Ltd. UK)

ผล

จากตัวอย่างปลาทั้งหมดจำนวน 997 ตัว ประกอบด้วย ปลานิล 389 ตัว (39.02%) ปลาคาร์ป 266 ตัว (26.68%) และปลาอื่นๆ 342 ตัว (34.30%) พบปลาที่แสดงอาการของโรค HS จำนวน 320 ตัว (32.10%) และปลาที่ไม่แสดงอาการของโรค HS ซึ่งเป็นปลาป่วยที่ตายกะทันหันยังไม่แสดงอาการ และปลาปกติที่ต้องการทดสอบโรค จำนวน 677 ตัว (67.90%) แบ่งตามชนิดของปลาดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ชนิดของปลาที่ส่งตรวจระหว่างปี พ.ศ. 2547–2554

ชนิดของปลา	จำนวนตัวอย่างปลา (%)		รวม (%)
	แสดงอาการ HS	ไม่แสดงอาการ HS	
ปลานิล	167/997 (16.75)	222/997 (22.27)	389/997 (39.02)
ปลาคาร์ป	52/997 (5.22)	214/997 (21.46)	266/997 (26.68)
ปลาอื่นๆ*	101/997 (10.13)	241/997 (24.17)	342/997 (34.30)
รวม	320/997 (32.10)	677/997 (67.90)	997

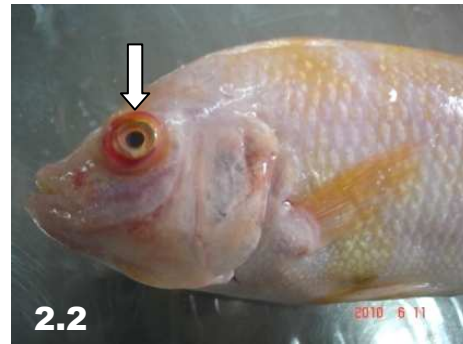
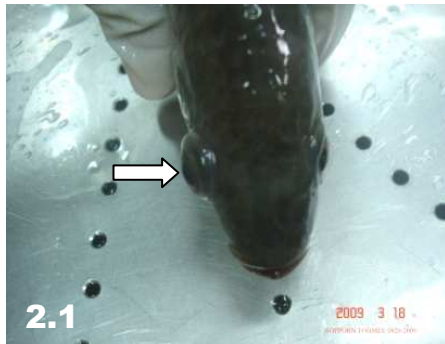
* ปลาอื่นๆ ได้แก่ ปลาสวายงาม และปลาเบญจพรรณ (ดุก ช่อน สวาย แรด ตะเพียน) เป็นต้น

ผลการตรวจทางพยาธิวิทยา

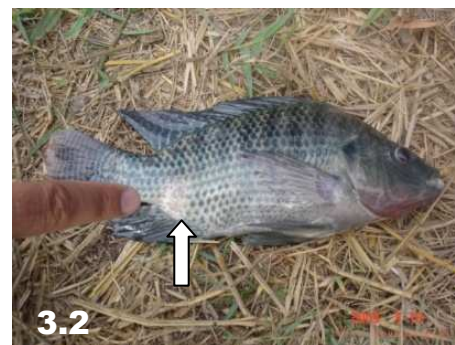
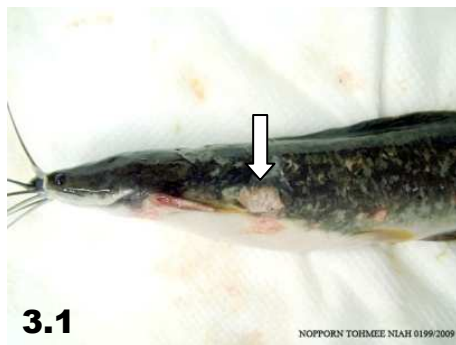
จากการตรวจสภาพภายนอกและภายในตัวปลาจำนวน 997 ตัวด้วยตาเปล่า ลักษณะอาการและรอยโรค HS ที่พบ ได้แก่ saddleback lesion บนตัวปลา (รูปที่ 1) ปลาแสดงอาการตาโปนและเลือดออกในลูกตา (รูปที่ 2) มีแผลหลุมหรือเนื้อตายขนาดต่างๆ ตามลำตัว (รูปที่ 3) และมีจุดเลือดออกบริเวณโคนครีบอกและโคนหาง (รูปที่ 4) หลังจากการเปิดผ่าซากพบว่าภายในช่องท้องมีน้ำสีเหลืองขุ่นน้ำดีขยายใหญ่ ลำไส้บวมน้ำ (รูปที่ 5) ผลการตรวจตัวอย่างปลาที่ส่งตรวจทางจุลพยาธิวิทยาจำนวน 317 ตัว ประกอบด้วยปลาที่แสดงอาการของโรค HS จำนวน 200 ตัว (63.90%) และปลาที่ไม่แสดงอาการของโรค HS จำนวน 117 ตัว (36.91%) พบปลาที่มีรอยโรครวมทั้งหมดจำนวน 210 ตัว (66.24%) ดังแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งรอยโรคที่พบ ได้แก่ ulcerative dermatitis และ inflammatory cell infiltration ร่วมกับ granulation tissues และ hemorrhages จำนวนมากที่บริเวณผิวหนังที่มีการอักเสบแบบเรื้อรัง การอักเสบเรื้อรังของเหงือก ตับ ลำไส้ และกระเพาะอาหาร multifocal hepatic necrosis ที่ตับและม้าม แต่เมื่อทำการย้อมสี acid fast เนื้อเยื่อที่มีรอยโรคคล้าย granuloma พบว่าให้ผลลบ ที่ลำไส้พบ submucosal edema ร่วมกับ mononuclear cell infiltration และที่สมองพบ nonsuppurative encephalitis ร่วมกับ glia nodule



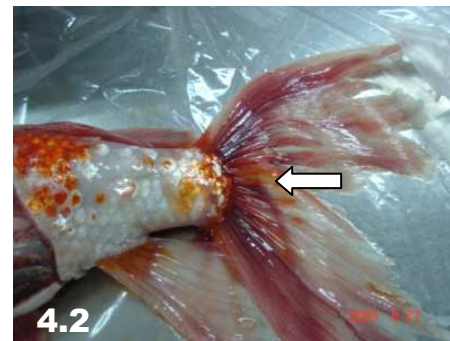
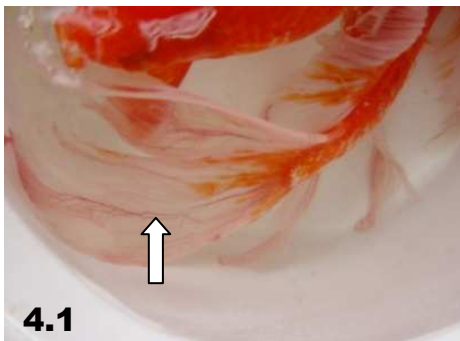
รูปที่ 1 ลักษณะการเกิดรอยโรค Saddleback lesion ในลูกปลานิลที่ติดเชื้อ *Flavobacterium columnare*



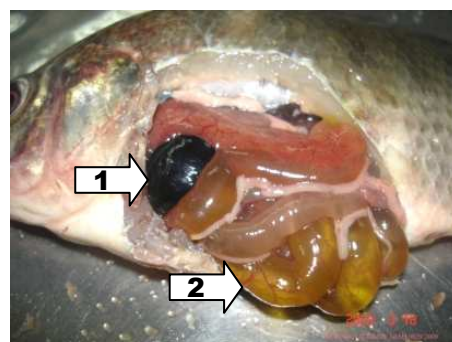
รูปที่ 2 อาการตาโปนในปลานิล (2.1) เลือดออกในลูกตาของปลาทับทิม (2.2)



รูปที่ 3 ลักษณะแผลหลุมหรือเนื้อตายขนาดต่างๆ บริเวณลำตัวของปลาดุก (3.1) และปลานิล (3.2)



รูปที่ 4 ลักษณะจุดเลือดออกบริเวณหาง (4.1) และโคนหางของปลาคาร์ป (4.2)



รูปที่ 5 ลักษณะภายในช่องท้องมีน้ำสีเหลือง ผนังลำตัวขยายใหญ่ (ลูกศร 1) และลำไส้บวม (ลูกศร 2) ในปลานิลที่ติดเชื้อ *Streptococcus agalactiae*

ผลการตรวจทางพิษวิทยา

จากตัวอย่างปลาทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรค HS จำนวนรวม 231 ตัว ที่ส่งตรวจทางพิษวิทยา พบสารตะกั่วปัจจัยเดียวในเนื้อและลำไส้ของปลานิล ≥ 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ppm) จำนวน 3 ตัว (1.30%) ดังแสดงในตารางที่ 2 และพบสารตะกั่ว < 1 ppm จำนวน 10 ตัว (4.33%) ซึ่งปลาทั้ง 10 ตัวนี้ พบสารตะกั่วร่วมกับปัจจัย/สาเหตุอื่นๆ เช่น เชื้อแบคทีเรีย และ/หรือ ปรสิต ดังแสดงในตารางที่ 3 ทั้งนี้ไม่พบยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมทหรือออร์กาโนฟอสเฟตตกค้างในปลาทั้ง 231 ตัว

ผลการตรวจทางปรสิตวิทยา

จากตัวอย่างปลาทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรค HS จำนวนรวม 559 ตัว ที่ส่งตรวจทางปรสิตวิทยา พบปรสิตภายนอกที่เหียงอกและผิวหนังรวมทั้งหมดจำนวน 292 ตัว (52.24%) ดังแสดงในตารางที่ 2 แบ่งเป็นกลุ่ม Monogenea 40 ตัว (7.16%) และกลุ่ม Protozoa จำนวน 237 ตัว (42.40%) และพบทั้งสองกลุ่ม 15 ตัว (2.68%) เมื่อทำการแยกชนิดของปรสิตภายนอกที่ตรวจพบ พบว่าปรสิตในกลุ่ม Monogenea คือ *Dactylogyrus* spp. และปรสิตในกลุ่ม Protozoa คือ *Epistylis* spp., *Oodinium* spp. และ *Trichodina* spp. ทั้งนี้จากตัวอย่างปลา 292 ตัว ที่พบปรสิต เป็นการพบปรสิตร่วมกับปัจจัย/สาเหตุอื่นๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส และสารพิษเป็นจำนวนรวม 180 ตัว (61.64%) ดังแสดงในตารางที่ 3

ผลการตรวจทางไวรัสวิทยา

จากตัวอย่างปลาทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรค HS จำนวนรวม 266 ตัว ที่ส่งตรวจทางไวรัสวิทยา พบ DNA ของเชื้อ koi herpes virus (KHV) จำนวน 108 ตัว (40.60%) ดังแสดงในตารางที่ 2 เป็นการพบเชื้อ KHV เพียงชนิดเดียวจำนวน 104 ตัว (39.10%) และพบเชื้อ KHV ร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อปรสิตจำนวน 4 ตัว (1.50%) ดังแสดงในตารางที่ 3 ทั้งนี้ตัวอย่างปลาทั้ง 266 ตัว ให้ผลลบในการตรวจหา RNA ของเชื้อ spring viraemia of carp virus (SVCV)

ผลการตรวจทางแบคทีเรียวิทยา

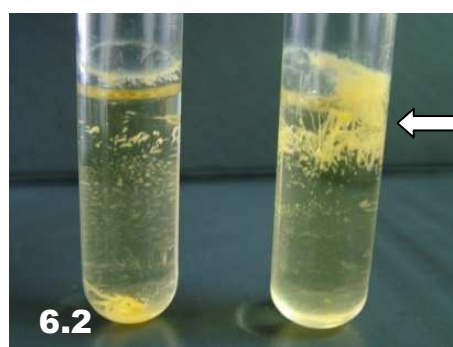
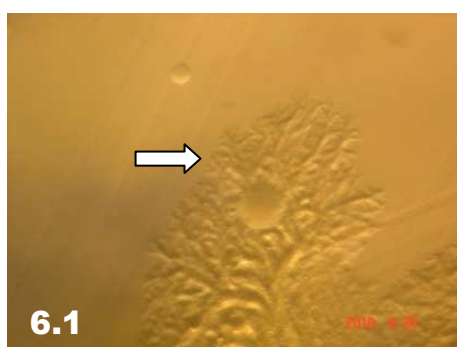
จากตัวอย่างปลาทั้งที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรค HS จำนวนรวม 740 ตัว ที่ส่งตรวจทางแบคทีเรียวิทยา พบปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งหมดจำนวน 454 ตัว (61.35%) เป็นปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวจำนวนรวม 282 ตัว (38.11%) และติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกัน 2-5 ชนิด จำนวนรวม 172 ตัว (23.24%) ดังแสดงในตารางที่ 2 ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่พบจากการดูตัวอย่างสดด้วยกล้องจุลทรรศน์ได้แก่ ลักษณะการเกาะรวมตัวกันคล้ายกองฟางของเชื้อ *Flavobacterium* spp. ที่บริเวณซีเหงือกและผิวหนังปลา ลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ AOA มีสีเหลือง แบน ขอบหยักคล้ายรากไม้ (รูปที่ 6.1) ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ AOB จะพบลักษณะ pellicle ring ติดกับผนังของหลอด (รูปที่ 6.2) สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ SBA และ MC พบโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียหลายชนิด หลังจากเพาะแยกเชื้อ (subculture) สามารถจำแนกชนิดเชื้อตามลักษณะโคโลนีและคุณสมบัติทางชีวเคมีได้ 9 ชนิด คือ *A. hydrophila*, *A. sobria*, *E. tarda*, *F. columnare*, *P. shigelloides*, *S. putrefaciens*, *S. agalactiae*, *V. cholera* และ *V. fluvialis* ทั้งนี้จากปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียจำนวน 454 ตัว เป็นปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว 267 ตัว และติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับปัจจัย/สาเหตุอื่น 187 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ผลการตรวจวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

ผล	จำนวนตัวอย่างปลา (%)		รวม (%)
	แสดงอาการ HS	ไม่แสดงอาการ HS	
ผลการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา	200/317 (63.09)	117/317 (36.91)	317/317 (100.00)
พบรอยโรคทางจุลพยาธิ	193/317 (60.88)	17/317 (5.36)	210/317 (66.24)
ไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิ	7/317 (2.21)	100/317 (31.55)	107/317 (33.76)
ผลการตรวจทางพิษวิทยา	10/231 (4.33)	3/231 (1.30)	13/231 (5.63)
สารตะกั่ว ≥ 1 ppm	0/231 (0.00)	3/231 (1.30)	3/231 (1.30)
สารตะกั่ว < 1 ppm	10/231 (4.33)	0/231 (0.00)	10/231 (4.33)
ผลการตรวจทางปรสิตวิทยา	157/559 (28.09)	135/559 (24.15)	292/559 (52.24)
Monogenea	12/559 (2.15)	28/559 (5.01)	40/559 (7.16)
Protozoa	140/559 (25.05)	97/559 (17.35)	237/559 (42.40)
Monogenea และ Protozoa	5/559 (0.89)	10/559 (1.79)	15/559 (2.68)
ผลการตรวจทางไวรัสวิทยา	40/266 (15.04)	68/266 (25.56)	108/266 (40.60)
Koi herpes virus	40/266 (15.04)	68/266 (25.56)	108/266 (40.60)
ผลการตรวจทางแบคทีเรียวิทยา	260/740 (35.13)	194/740 (26.22)	454/740 (61.35)
พบติดเชื้อแบคทีเรียชนิดเดี่ยวรวม	128/740 (17.30)	154/740 (20.81)	282/740 (38.11)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	65/740 (8.78)	65/740 (8.78)	130/740 (17.56)
<i>Aeromonas sobria</i>	24/740 (3.24)	51/740 (6.89)	75/740 (10.13)
<i>Edwardsiella tarda</i>	0/740 (0.00)	0/740 (0.00)	0/740 (0.00)
<i>Flavobacterium columnare</i>	0/740 (0.00)	10/740 (1.35)	10/740 (1.35)
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	6/740 (0.81)	21/740 (2.84)	27/740 (3.65)
<i>Shewanella putrefaciens</i>	0/740 (0.00)	0/740 (0.00)	0/740 (0.00)
<i>Streptococcus agalactiae</i>	26/740 (3.51)	1/740 (0.14)	27/740 (3.65)
<i>Vibrio cholera</i>	1/740 (0.14)	5/740 (0.67)	6/740 (0.81)
<i>Vibrio fluvialis</i>	6/740 (0.81)	1/740 (0.14)	7/740 (0.95)
พบติดเชื้อแบคทีเรียร่วม 2-5 ชนิดรวม	132/740 (17.83)	40/740 (5.41)	172/740 (23.24)
<i>A. hydrophila</i> และ <i>P. shigelloides</i>	58/740 (7.84)	33/740 (4.46)	91/740 (12.30)
<i>A. hydrophila</i> และ <i>V. cholera</i>	13/740 (1.76)	6/740 (0.81)	19/740 (2.57)
<i>A. sobria</i> และ <i>S. agalactiae</i>	12/740 (1.62)	1/740 (0.14)	13/740 (1.76)
<i>E. tarda</i> และ <i>P. shigelloides</i>	11/740 (1.48)	0/740 (0.00)	11/740 (1.48)
<i>A. hydrophila</i> , <i>E. tarda</i> และ <i>P. shigelloides</i>	1/740 (0.14)	0/740 (0.00)	1/740 (0.14)
<i>A. hydrophila</i> , <i>P. shigelloides</i> และ <i>S. agalactiae</i>	4/740 (0.54)	0/740 (0.00)	4/740 (0.54)
<i>A. sobria</i> , <i>S. agalactiae</i> และ <i>V. fluvialis</i>	1/740 (0.14)	0/740 (0.00)	1/740 (0.14)
<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> , <i>S. putrefaciens</i> และ <i>V. cholera</i>	5/740 (0.67)	0/740 (0.00)	5/740 (0.67)
<i>A. hydrophila</i> , <i>F. columnare</i> , <i>P. shigelloides</i> และ <i>V. fluvialis</i>	2/740 (0.27)	0/740 (0.00)	2/740 (0.27)
<i>A. sobria</i> , <i>S. putrefaciens</i> , <i>S. agalactiae</i> และ <i>V. fluvialis</i>	6/740 (0.81)	0/740 (0.00)	6/740 (0.81)
<i>A. hydrophila</i> , <i>A. sobria</i> , <i>F. columnare</i> , <i>S. agalactiae</i> , และ <i>V. cholera</i>	9/740 (1.22)	0/740 (0.00)	9/740 (1.22)
<i>A. hydrophila</i> , <i>E. tarda</i> , <i>P. shigelloides</i> , <i>V. cholera</i> , และ <i>V. fluvialis</i>	10/740 (1.35)	0/740 (0.00)	10/740 (1.35)

ตารางที่ 3 ผลการตรวจที่พบหลายปัจจัย/สาเหตุร่วมของการเกิดโรค HS

ปัจจัย/สาเหตุ	จำนวนตัวอย่างปลา (%)		รวม (%)
	แสดงอาการ HS	ไม่แสดงอาการ HS	
แบคทีเรียและปรสิต	111/997 (11.13)	62/997 (6.22)	173/997 (17.35)
แบคทีเรียและตะกั่ว (< 1 ppm)	7/997 (0.70)	0/997 (0.00)	7/997 (0.70)
แบคทีเรีย ปรสิต และไวรัส (KHV)	4/997 (0.40)	0/740 (0.00)	4/997 (0.40)
แบคทีเรีย ปรสิต และตะกั่ว (< 1 ppm)	3/997 (0.30)	0/997 (0.00)	3/997 (0.30)
รวม	125/997 (12.53)	62/997 (6.22)	187/997 (18.75)



รูปที่ 6 ลักษณะโคโลนีสีเหลือง แบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ AOA (6.1) และลักษณะ pellicle ring ติดกับผนังของหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ AOB (6.2)

ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ

ผลการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียที่เพาะแยกได้ 9 ชนิดต่อยาต้านจุลชีพ 6 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียที่มีเปอร์เซ็นต์ความไวสูงต่อยาต้านจุลชีพชนิดต่างๆ ดังนี้

- Amoxicillin ได้แก่ *F. columnare*, *S. agalactiae* และ *V. fluvialis*
- Doxycycline ได้แก่ *A. sobria*, *F. columnare*, *P. shigelloides*, *S. agalactiae* และ *V. fluvialis*
- Gentamicin ได้แก่ *A. hydrophila*, *A. sobria*, *E. tarda*, *S. putrefaciens*, *V. cholerae* และ *V. fluvialis*
- Ofloxacin ได้แก่ *A. hydrophila*, *F. columnare*, *P. shigelloides*, *V. cholerae* และ *V. fluvialis*
- Sulfamethoxazole/trimethoprim ได้แก่ *A. hydrophila*, *E. tarda*, *P. shigelloides*, *S. putrefaciens* และ *V. fluvialis*
- Tetracycline ได้แก่ *F. columnare*

ตารางที่ 4 ผลทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพ

Species	Antibiotics μ g	Resistant (%)	Intermediate (%)	Sensitive (%)
<i>Aeromonas hydrophila</i> 16 isolates	Amoxicillin 10	16 (100)	0 (0)	0 (0)
	Doxycycline 30	3 (18.75)	2 (12.5)	11 (68.75)
	Gentamicin 10	0 (0)	2 (12.5)	14 (87.75)
	Ofloxacin 5	0 (0)	2 (12.5)	14 (87.75)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	0 (0)	0 (0)	16 (100)
	Tetracycline 30	9 (56.25)	0 (0)	7 (43.75)
<i>Aeromonas sobria</i> 12 isolates	Amoxicillin 10	9 (75)	0 (0)	3 (25)
	Doxycycline 30	1 (8.33)	1 (8.33)	10 (83.34)
	Gentamicin 10	1 (8.33)	1 (8.33)	10 (83.34)
	Ofloxacin 5	2 (16.67)	2 (16.67)	8 (66.66)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	3 (25)	0 (0)	9 (75)
	Tetracycline 30	5 (41.67)	3 (25)	4 (33.33)
<i>Edwardseilla tarda</i> 9 isolates	Amoxicillin 10	3 (33.33)	3 (33.33)	3 (33.33)
	Doxycycline 30	3 (33.33)	3 (33.33)	3 (33.33)
	Gentamicin 10	0 (0)	0 (0)	9 (100)
	Ofloxacin 5	3 (33.33)	3 (33.33)	3 (33.33)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	0 (0)	0 (0)	9 (100)
	Tetracycline 30	3 (33.33)	3 (33.33)	3 (33.33)
<i>Flavobacterium columnare</i> 3 isolates	Amoxicillin 10	0 (0)	0 (0)	3 (100)
	Doxycycline 30	0 (0)	0 (0)	3 (100)
	Gentamicin 10	0 (0)	1 (33.33)	2 (66.67)
	Ofloxacin 5	0 (0)	0 (0)	3 (100)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	1 (33.33)	2 (66.67)	0 (0)
	Tetracycline 30	0 (0)	0 (0)	3 (100)
<i>Plesiomonas shigelloides</i> 10 isolates	Amoxicillin 10	10 (100)	0 (0)	0 (0)
	Doxycycline 30	2 (20)	0 (0)	8 (80)
	Gentamicin 10	0 (0)	6 (60)	4 (40)
	Ofloxacin 5	0 (0)	0 (0)	10 (100)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	0 (0)	0 (0)	10 (100)
	Tetracycline 30	2 (20)	1 (10)	7 (70)
<i>Shewanella putrefaciens</i> 7 isolates	Amoxicillin 10	0 (0)	0 (0)	7 (100)
	Doxycycline 30	7 (100)	0 (0)	0 (0)
	Gentamicin 10	0 (0)	0 (0)	7 (100)
	Ofloxacin 5	7 (100)	0 (0)	0 (0)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	0 (0)	0 (0)	7 (100)
	Tetracycline 30	3 (100)	0 (0)	0 (0)
<i>Streptococcus agalactiae</i> 13 isolates	Amoxicillin 10	0 (0)	0 (0)	13 (100)
	Doxycycline 30	0 (0)	0 (0)	13 (100)
	Gentamicin 10	13 (100)	0 (0)	0 (0)
	Ofloxacin 5	0 (0)	4 (30.77)	9 (69.23)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	4 (30.77)	0 (0)	9 (69.23)
	Tetracycline 30	9 (69.23)	4 (30.77)	0 (0)
<i>Vibrio cholera</i> 6 isolates	Amoxicillin 10	4 (66.67)	1 (16.67)	1 (16.67)
	Doxycycline 30	2 (33.33)	0 (0)	4 (66.67)
	Gentamicin 10	0 (0)	0 (0)	6 (100)
	Ofloxacin 5	0 (0)	0 (0)	6 (100)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	2 (33.33)	1 (16.67)	3 (50)
	Tetracycline 30	4 (66.67)	0 (0)	2 (33.33)
<i>Vibrio fluvialis</i> 6 isolates	Amoxicillin 10	0 (0)	0 (0)	6 (100)
	Doxycycline 30	0 (0)	0 (0)	6 (100)
	Gentamicin 10	0 (0)	0 (0)	6 (100)
	Ofloxacin 5	0 (0)	0 (0)	6 (100)
	Sulfamethoxazole/Trimethoprim 25	0 (0)	0 (0)	6 (100)
	Tetracycline 30	3 (50)	3 (50)	0 (0)

วิจารณ์และสรุป

จากการศึกษาปัญหาเฮโมราจิกเซฟติซีเมียในปลาน้ำจืดโดยการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา พบปลาที่แสดงอาการของโรค HS แต่ไม่มีรอยโรค 2.21% เนื่องจากตัวอย่างปลาเกิด autolysis และการพบปลาที่ยังไม่แสดงอาการของโรค HS แต่มีรอยโรค 5.36% นั้น อาจมีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงของ host ที่ยังอยู่ในระยะแรกของการติดเชื้อ ซึ่งลักษณะทางพยาธิวิทยาโดยรวมจะคล้ายกันกับปลาที่ติดเชื้อเกือบทุกชนิดจึงไม่สามารถบ่งชี้ถึงปัจจัย/สาเหตุของการเกิดโรคได้ มีรายงานว่าปลาคาร์ปที่ติดเชื้อไวรัส SVCV จะแสดงอาการคล้ายกับการติดเชื้อ *Aeromonas* spp. ซึ่งอาจทำให้สับสนในการตรวจวินิจฉัยได้ โดยเฉพาะการมีจุดเลือดออกและท้องมาน (Petty et al., 2012) ยกเว้นปลาที่ติดเชื้อไวรัส VHSV นอกจากจะแสดงอาการ HS แล้วยังแสดงอาการทางระบบประสาทร่วมด้วย เช่น ว่ายน้ำอย่างรุนแรง โดดเต็งบนผิวน้ำ (flashing) และว่ายน้ำควงสว่าน (spiraling) ซึ่งจะต่างจากปลาที่ติดเชื้อ *S. agalactiae* หรือ *S. iniae* ในสมอง โดยปลาที่ติดเชื้อ VHSV มีแนวโน้มที่จะไม่หลบหนีเมื่อถูกตาข่าย (Rolland and Egrie, 2006; OIE, 2009) Wada et al. (2006) รายงานว่าปลาที่ติดเชื้อไวรัส KHV นอกจากจะพบรอยโรคที่อวัยวะภายในต่างๆ แล้ว ยังพบรอยโรคที่เหงือกและระบบประสาทส่วนกลางด้วย ส่วนการตรวจสารพิษตกค้างไม่พบยาฆ่าแมลงกลุ่มคาร์บาเมตหรือออร์กาโนฟอสเฟต แต่พบสารตะกั่วตกค้างในเนื้อปลา ≥ 1 ppm ในปลาที่ไม่แสดงอาการ HS จำนวน 3 ตัวอย่าง ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบรายงานที่แสดงให้เห็นว่าปลาที่ได้รับพิษสารตะกั่วจะแสดงอาการ HS หรือไม่ แต่มีรายงานการศึกษาทดลองเลี้ยงปลาหางนกยูงในน้ำที่มีปริมาณสารตะกั่ว 2 และ 5 ppm พบว่าปลาเจริญเติบโตช้า อัตราการขยายพันธุ์ต่ำ อัตราการป่วยและตายสูงขึ้น (Crandall and Goodnight, 1962) กรมประมงได้ออกมาตรฐานการจัดการฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเพื่อการส่งออกโดยกำหนดระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารตะกั่วในน้ำที่ไม่เป็นอันตรายต่อสัตว์น้ำไว้ไม่เกิน 0.05 ppm (กรมประมง, 2545) ดังนั้นเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาในพื้นที่หรือแหล่งน้ำที่เป็นพื้นที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนสารพิษรวมถึงสารตะกั่วควรตรวจสอบคุณภาพน้ำอย่างสม่ำเสมอเพื่อความปลอดภัยต่อทั้งสุขภาพปลาและสุขภาพผู้บริโภค ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขได้กำหนดค่ามาตรฐานความเข้มข้นของสารตะกั่วในอาหารไว้ไม่เกิน 1 ppm (กระทรวงสาธารณสุข, 2529) ส่วนผลการตรวจพบสารตะกั่วตกค้างในเนื้อปลา < 1 ppm ร่วมกับปัจจัย/สาเหตุอื่นๆ ในปลาที่แสดงอาการของโรค HS นั้น ยังไม่สามารถสรุปได้เนื่องจากมีจำนวนตัวอย่างปลาที่พบน้อย อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ที่อาการของโรค HS ที่แสดงให้เห็นอาจเกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกับสารตะกั่ว

จากการตรวจทางปรสิตวิทยาพบจำนวนปลาที่แสดงอาการและไม่แสดงอาการของโรค HS ใกล้เคียงกัน ในปลาจำนวน 157 ตัว ที่ติดเชื้อปรสิตและแสดงอาการของโรค HS เป็นปลาที่ติดเชื้อปรสิตร่วมกับปัจจัย/สาเหตุอื่นเป็นจำนวนมากถึง 125 ตัว (79.62%) สอดคล้องกับรายงานของสมเกียรติ (2552) ที่พบว่าการตายด้วยโรค HS ในปลานิล เกิดจากการติดเชื้อปรสิตร่วมกับเชื้ออื่นๆ หลายชนิด (complex etiological agents) ในการศึกษาพบเชื้อปรสิตกลุ่ม Protozoa มากที่สุด (42.40%) สอดคล้องกับ

การศึกษาของ Hoole et al.(2008) ที่พบ Protozoa หลายชนิดในปลาตัวเดียวกัน และเชื้อปรสิตที่พบมากที่สุดในการศึกษานี้ คือ *Trichodina* spp. เช่นเดียวกับรายงานของ Kim et al. (2002) ซึ่งพบความชุกของการติด *Trichodina* spp. ถึง 100% นอกจากนี้พบเชื้อปรสิตกลุ่ม Monogenea คือ *Dactylogyrus* spp. เฉพาะที่เหงือก เช่นเดียวกับการศึกษาของ Buchmann and Bresciani (2006) และ Keremah and Inko-Tariah (2013) การติดเชื้อปรสิตภายนอกมากกว่า 1 ชนิด อาจส่งผลให้ปลาอ่อนแอเกิดโรค HS ได้ง่ายขึ้น และอาจมีการติดเชื้ออื่นแทรกซ้อนภายหลังได้ ซึ่งการสุขาภิบาลฟาร์มที่ดี การจัดการคุณภาพน้ำที่เหมาะสม ไม่เลี้ยงปลาอย่างหนาแน่น และนำปลามาเลี้ยงจากแหล่งเพาะลูกปลาที่น่าเชื่อถือปราศจากเชื้อปรสิต จะช่วยป้องกันปัญหาการติดเชื้อปรสิตได้ในทางตรงและป้องกันปัญหาการเกิดโรค HS ในทางอ้อม ส่วนการตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อไวรัสที่ทำให้เกิดโรค VHS พบ DNA ของเชื้อ KHV (Cyprinid Herpesvirus type-3; CyHV3) จากปลาคาร์ปที่แสดงอาการของโรค HS 13.53% ไม่แสดงอาการของโรค HS 25.56% และพบการติดเชื้อ KHV ร่วมกับการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อปรสิต 1.50% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pikulkaew et al. (2009) ที่รายงานการพบเชื้อฉวยโอกาสทั้งเชื้อปรสิตและเชื้อราในปลาคาร์ปที่ติดเชื้อ KHV ด้วย ทั้งนี้เชื้อ KHV และ SVCV มักพบในตระกูลของปลาคาร์ป และเนื่องจากปลาในตระกูลนี้เป็นที่นิยมในการนำเข้าจากต่างประเทศ นันทริกา และจิรศักดิ์ (2548) จึงได้ทำการสำรวจเชื้อ KHV ของปลาคาร์ปในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล พบปลาคาร์ปติดเชื้อ KHV 41.18% ต่อมา Srisuvan et al. (2010a, b) ได้พัฒนาการตรวจและจำแนกชนิดเชื้อ KHV และนำมาใช้ศึกษาเชื้อที่ตรวจพบในกรุงเทพฯ พบว่าเป็นชนิด CyHV3-J (Japanese genotype) แต่ไม่พบชนิด CyHV3-U (American genotype) และชนิด CyHV3-I (Israeli genotype) ส่วนการติดเชื้อ SVCV ยังไม่มีรายงานการตรวจพบในประเทศไทย (กรมประมง, 2547) เช่นเดียวกับเชื้อไวรัส VHSV ที่ไม่พบว่ามีรายงานการเกิดกับปลาสายพันธุ์ที่เลี้ยงในประเทศไทยเช่นกัน (OIE, 2009; Rolland and Egrie, 2006) แต่มีรายงานการพบเชื้อไวรัสชนิดใหม่ที่อาจเป็นสาเหตุหลักในการทำให้ปลาเสียดออ่อนแอและติดเชื้อราทำให้เกิดโรค Epizootic Ulcerative Syndrome (EUS) (Kreethachat, 2005) อย่างไรก็ตามการศึกษาเชื้อไวรัสที่ก่อโรคในปลาในประเทศไทยยังมีข้อจำกัดในด้านขีดความสามารถของห้องปฏิบัติการในการเพาะและจำแนกเชื้อ จึงควรมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเพื่อเพิ่มขีดความสามารถในด้านนี้ให้มากขึ้น และเนื่องจากการติดเชื้อไวรัสยังไม่มีการรักษาที่ได้ผล และการทำวัคซีนต้องใช้ต้นทุนสูง ดังนั้นมาตรการในการควบคุมป้องกันโรคที่ถูกรื้อ และกำหนดเกณฑ์สถานกักกันปลารวมถึงข้อพึงปฏิบัติในการกักกันปลานำเข้าจากต่างประเทศ จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในการป้องกันโรคระบาด (สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด, 2549; Perelberg et al., 2005)

จากผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรีย พบเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ 8 ชนิด และแกรมบวก 1 ชนิด (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับรายงานของ Cipriano (2001), Coche (1982), Conroy and Conroy (2008), Plumb (1997) และ Purivirojkul et al. (2005) ที่รายงานการพบเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก เชื้อแบคทีเรียที่พบมากที่สุด คือ *A. hydrophilla* รองลงมา ได้แก่ เชื้อ *A. sobria* และ *P. shigelloides*

ตามลำดับเช่นเดียวกับรายงานของ Purivirojkul et al. (2005) ที่พบการติดเชื้อ *A. hydrophilla* ในลูกปลา บิกมากที่สุดถึง 66% ซึ่งแตกต่างจาก Chinabut et al. 2012 ที่พบการติดเชื้อ *V. cholerae* มากที่สุดใน ปลาตุ๊ก 32.67% รองลงมาคือ *A. hydrophilla* 24.67% การพบเชื้อแบคทีเรียในปลาที่ไม่แสดงอาการของ โรค HS เป็นการพบเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวกับที่อาจพบได้ในปลาปกติ (Purivirojkul et al., 2005; Conroy and Conroy, 2008) ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบตัวอย่างปลาที่ติดเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียว 38.11% และติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกัน 2-5 ชนิด 23.24% โดยที่การติดเชื้อแบคทีเรียชนิดเดียวมีจำนวนปลาที่แสดงอาการ และไม่แสดงอาการของโรค HS ใกล้เคียงกัน ในขณะที่การติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกัน 2-5 ชนิด มีจำนวนปลา ที่แสดงอาการของโรค HS มากกว่าไม่แสดงอาการของโรค HS ถึง 3 เท่า การติดเชื้อร่วมกันที่พบมากที่สุด คือ *A. hydrophilla* ร่วมกับ *P. shigelloides* รองลงมา คือ *A. hydrophilla* ร่วมกับ *V. cholerae*, *A. sobria* ร่วมกับ *S. agalactiae* และ *E. tarda* ร่วมกับ *P. shigelloides* เช่นเดียวกับการศึกษาของ Van Damme and Vandepitte (1980) ที่พบ *E. tarda* ร่วมกับ *P. shigelloides* เช่นกัน สำหรับการติดเชื้อแบคทีเรียร่วมกันที่มีรายงาน ได้แก่ Bragg (1988) พบ *A. hydrophilla* ร่วมกับ *E. tarda*, Marks et al. (1980) พบ *F. columnare* ร่วมกับ *Corynebacterium* spp., Miyashita (1984) พบ *E. tarda* ร่วมกับ *P. fluorescens*, และ Lightner et al. (1988) พบการติดเชื้อร่วมกันของแบคทีเรียถึง 5 ชนิด ดังนั้นการตัดสินใจเลือกให้ยาต้านจุลชีพในการรักษา โรค BHS จึงควรพิจารณาจากผลการทดสอบทางห้องปฏิบัติการเป็นสำคัญ ถึงชนิดและจำนวนชนิดของ เชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค รวมไปถึงผลทดสอบความไวของเชือนั้นต่อยาต้านจุลชีพ ซึ่งเดิมเกษตรกรเลือกใช้ยา ที่สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา (อย.) อนุญาตให้ใช้ในสัตว์น้ำและมีขายในท้องตลาด ได้แก่ ยากลุ่ม amoxicillin, sulfamethoxazole/trimethoprim และ tetracycline โดยการรักษาปลาป่วยด้วย amoxicillin เพื่อหวังผลในการรักษาการติดเชื้อแกรมบวก เช่น *Streptococcus* spp. นั้น สอดคล้องกับผลการศึกษา นี้ที่พบว่าเชื้อ *Streptococcus agalactiae* มีความไว 100% และเช่นเดียวกับรายงานของ รัชต์ และดวงพร (2550) พบว่าเชื้อ *Streptococcus* spp. มีความไวต่อยากลุ่มนี้ 94.3% แต่ในปัจจุบันสถานการณ์การติดเชื้อ แบคทีเรียได้เปลี่ยนไปพบมีการติดเชื้อแบคทีเรียแกรมลบร่วมกันหลายชนิดมากขึ้น (ประพันธ์ศักดิ์ และนนทวิทย์, 2552) ซึ่งในการศึกษานี้พบว่าเชื้อ *A. hydrophilla* และ *P. shigelloides* มีความไวต่อยา amoxicillin ทำให้เกษตรกรไม่ประสบผลสำเร็จในการรักษาเมื่อพบว่ามีเชื้อเหล่านี้ร่วมด้วย ส่วนการเลือกใช้ยา sulfamethoxazole/trimethoprim ยังใช้ได้กับเชื้อทั้ง 9 ชนิด ในทางตรงข้ามการเลือกใช้ยา tetracycline จะไม่ให้ผลดีในการรักษา โดยเฉพาะเมื่อมีการติดเชื้อ *S. putrefaciens* ร่วมด้วย ส่วนยาชนิดอื่นๆ ได้แก่ doxycycline, gentamicin และ ofloxacin ใช้ได้กับเชื้อหลายชนิด ยกเว้นถ้ามีการติดเชื้อ *S. putrefaciens* และ *S. agalactiae* ร่วมด้วย อย่างไรก็ตาม ofloxacin เป็นยาที่ควรสงวนไว้ใช้รักษาการติดเชื้อแบคทีเรีย ในมนุษย์ ถึงแม้ว่า อย.จะไม่มีข้อกำหนดห้ามใช้ยา 3 ชนิดนี้ในสัตว์น้ำก็ตาม นอกจากนี้ถ้าผลการทดสอบ ความไวของเชืต่อยาต้านจุลชีพของยาบางชนิดมีค่าอยู่ในช่วง intermediate และ resistance ควรหาค่า minimum inhibition concentration หรือ MIC (Wikler et al., 2006) เพื่อให้ทราบขนาดของยาที่แน่ชัด

ก่อนนำไปปรับใช้เพื่อการรักษา ในกรณีการติดเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดร่วมกัน อาจเป็นการยากที่จะเลือกใช้ยาเพียงชนิดเดียวในการรักษา การเลือกให้ยาสองชนิดร่วมกันต้องพิจารณาถึงฤทธิ์ที่เสริมกัน หรือหักล้างกัน และความเป็นพิษของยาด้วย เช่น ยา gentamicin มีความเป็นพิษต่อไต (มาลินี, 2541)

การศึกษาครั้งนี้เป็นการเฝ้าระวังทางห้องปฏิบัติการครั้งแรกในประเทศไทยและสรุปได้ว่า ปัญหาของโรค HS ที่พบในปลาน้ำจืดที่ส่งมาตรวจวินิจฉัยโรคที่สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติระหว่างปี พ.ศ. 2547-2554 เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียสูงถึง 61.35% (454/740) และเกิดจากการติดเชื้อไวรัส 40.60% (108/266) ซึ่งการติดเชื้อไวรัสมักเกิดในปลาน้ำจืดจากต่างประเทศ จึงต้องอาศัยมาตรการในการควบคุม ป้องกัน และเฝ้าระวังปลาน้ำจืดอย่างเข้มงวด ส่วนการรักษาด้วยยาต้านจุลชีพในกรณีของโรค BHS เกษตรกรควรปรึกษาสัตวแพทย์ และใช้ยาเท่าที่จำเป็น พร้อมทั้งหยุดใช้ยาในระยะเวลาที่เหมาะสม แม้จะเป็นยาที่ อย. อนุญาตให้ใช้ได้ก็ตาม เพื่อไม่ให้เกิดการดื้อยา และการตกค้างของยาในปลาซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณหัวหน้ากลุ่มแบคทีเรียและเชื้อราที่ให้คำปรึกษาและการสนับสนุน ขอขอบคุณ สพ.ญ.จันทรา วัฒนเมธานนท์ กลุ่มปรสิตวิทยา เจ้าหน้าที่กลุ่มแบคทีเรียและเชื้อรา และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและชันสูตรโรคสัตว์น้ำทุกท่านที่ให้ความร่วมมือและช่วยเหลือในการดำเนินการศึกษานี้ให้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กมลพร ภวภูตานนท์ ณ มหาสารคาม และสุปราณี ชินบุตร. 2526. ปรสิตปลาน้ำจืดของไทย. พิมพ์ครั้งที่ 1. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. กรุงเทพฯ. 63 หน้า.
- กรมประมง. 2545. มาตรฐานการจัดการฟาร์มเพาะเลี้ยงปลาสวยงามเพื่อการส่งออก. สำนักงานประมงจังหวัดอ่างทอง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. [On line]. Available : http://www.fisheries.go.th/fpo-angthong/known_f_4.htm. [25 กันยายน 2556]
- กรมประมง. 2546. ประกาศกรมประมง เรื่อง “การงดอนุญาตให้นำปลาตระกูลคาร์ป (Crap fish)”. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. [On line]. Available : http://www.fisheries.go.th/management/18_11_03.doc. [25 กันยายน 2556]
- กรมประมง. 2547. ประกาศกรมประมง เรื่อง “การอนุญาตให้นำปลาตระกูลคาร์ปเข้ามาในราชอาณาจักรภายใต้ระบบการกักกันโรค”. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. [On line]. Available : http://www.fisheries.go.th/fish_test/form/news_crab.doc. [25 กันยายน 2556]
- กระทรวงสาธารณสุข. 2529. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 98 (พ.ศ. 2529) เรื่อง “มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน” กระทรวงสาธารณสุข.

- ชาญณรงค์ รอดคำ. 2550. โรคสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 33. ระหว่างวันที่ 31 ตุลาคม-2 พฤศจิกายน 2550. สัตวแพทย์สมาคมแห่งประเทศไทย. กรุงเทพฯ. หน้า 319-326.
- นันทริกา ชันซื่อ. 2549. การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำแช่ใบหูกวาแ่งและสารสกัดฟ้าทะลายโจรต่อการงอกของหางและปริมาณเม็ดเลือดแดงอัดแน่นในปลาแคร์ป. สัตวแพทย์สาร. 57(2): 52-62.
- นันทริกา ชันซื่อ และจิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์. 2548. การสำรวจโรคเคเฮวีของปลาแคร์ปในเขตกรุงเทพฯ และปริมณฑล ระหว่างเดือนมีนาคมถึงมิถุนายน พ.ศ. 2548. สัตวแพทย์สาร. 56(3): 13-21.
- ปภาศิริ ศรีโสภณภรณ์. 2538. โรคและพยาธิของสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์ริ้วเขียว กรุงเทพฯ. 184 หน้า.
- ประพันธ์ศักดิ์ ศิริชะภา และนนทวิทย์ อาริย์ชน. 2552. “โรคที่เป็นสาเหตุของการตายที่รุนแรงของปลานิลในประเทศไทย”. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. [On line]. Available: http://www.rdi.ku.ac.th/kasetresearch52/05-animal/prapansak_Nile/animal_00.html. [20 สิงหาคม 2556]
- ประไพศิริ สิริกาญจน. 2546. ความรู้เรื่องปรสิตของสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 6. ห้างหุ้นส่วนจำกัด สกายเวิร์ด แอ็ดเวอร์ไทซิง กรุงเทพฯ. 270 หน้า.
- มาลินี ลิ้มโกคา. 2541. ยาต้านจุลชีพ. พิมพ์ครั้งที่ 5. โรงพิมพ์จรัสสินทวงศ์ กรุงเทพฯ. 710 หน้า.
- รัชต์ ชัดติยะ และดวงพร พิษผล. 2550. การต้านทานยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* spp. จากปลานิล (*Oreochromis* sp.) ในกระชัง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. 1(2): 201-210.
- สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด. 2549. โรคไวรัสเคเฮวี. เอกสารเผยแพร่ความรู้. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 12 หน้า.
- สมเกียรติ กาญจนาคาร. 2552. “สถานการณ์โรคสัตว์น้ำที่สำคัญในปัจจุบัน; โรคปลานิล”. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. [On line]. Available : http://www.fisheries.go.th/fpo-cha-sao/data/Tilapia_Scenario.pdf. [12 สิงหาคม 2556]
- สมโภชน์ วีระกุล เอกชัย ภัทรพันธุ์วิเชียร พิทย กาญจนบุตร และประสาทพร บริสุทธิ์เพ็ชร. 2546. “โครงการศึกษาแนวทางวินิจฉัยสาเหตุการตายของปลานิลในลำน้ำพอง ในโครงการสหศาสตร์ศึกษาเพื่อพัฒนาแม่น้ำพองเชิงบูรณาการ”. บทคัดย่อ. ภาควิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม คณะวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 2 หน้า. [On line]. Available : <http://vet.kku.ac.th/medicine / research.htm>. [2 สิงหาคม 2556]
- สุรัชย์ พิกุลแก้ว ทองกร มีแย้ม วรธนา ศิริมานะพงษ์ และศรดา ติวงนันทกร. 2550. การตรวจหาเชื้อไวรัสเคเฮวีในปลาแคร์ป (*Cyprinus carpio koi*) โดยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อ โทมิดีนไคเนส ยีนส์ (thymidine kinase gene). วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 1(1): 42-49.

- Anacker, R.L. and Ordal, E.J. 1955. Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. J. Bacteriol. 70(6): 738-741.
- Bernardet, J.F. 1989. *Flexibacter columnaris*: first description in France and comparison with bacterial strains from other origins. Dis. Aquat. Org. 6(1): 37-44.
- Bondad-Reantaso, M.G., McGladdery, S.E., East, I. and Subasinghe, R.P. 2001. Asia Diagnostic Guide to Aquatic Animal Diseases. FAO Fisheries Technical Paper No. 402, Supplement 2. FAO, Rome. 240 p.
- Bowser, P.R. 2009. "Fish Diseases: Viral Hemorrhagic Septicemia (VHS)". NRAC Publication No. 201-2009. Northeastern Regional Aquaculture Center, University of Maryland. [On line]. Available : <http://www.nrac.umd.edu>. Accessed August 1, 2013.
- Bragg, R.R. 1988. First isolation of *Edwardsiella tarda* from fish in South Africa. Bull. Eur. Ass. Fish Pathol. 8: 84-88.
- Buchmann, K. and Bresciani, J. 2006. Monogenea (phylum Platyhelminthes). In: Fish diseases and disorders, volume 1: protozoan and metazoan infections. Edited by P.T.K. Woo. 2nd ed. CABI Publishing, Oxfordshire. p. 297-344.
- Camus, A.C., Durborow, R.M., Hemstreet, W.G., Thune, R.L. and Hawke, J.P. 1998. Aeromonas Bacterial Infections-Motile Aeromonad Septicemia. SRAC Publication No. 478: 4.
- CFSPH. 2007. "Viral Hemorrhagic Septicemia". [On line]. Available : www.cfsph.iastate.edu/viral_hemorrhagic_septicemia.pdf. Accessed August 5, 2013.
- Chinabut, S., Somsiri, T. and Khiowkaew, C. 2012. Bacterial Species Isolated from Hybrid Catfish (*Clarias gariepinus* x *C. macrocephalus*) and Snakehead (*Channa striatus*) Culture in Thailand. Proceedings of the 36th Kasetsart University Annual Conference. Bangkok, Thailand. p. 125.
- Cipriano, R.C. 2001. *Aeromonas hydrophila* and motile aeromonad septicemia of fish. U.S. Department of the interior, Fish and Wildlife Service, Division of Fishery Research, Washington D.C., USA. Fish Disease Leaflet. 68: 25.
- Coche, A.G. 1982. Cage culture of tilapias. In: The Biology and Culture of Tilapias. ICLARM Conference Proceedings, ICLARM, Manila, Philippines. p. 205-245.
- Conroy, G. and Conroy, D.A. 2006. Bacterial Haemorrhagic Septicaemia in Tilapias. Aquaculture Health International. 7: 7-8.
- Conroy, G. and Conroy, D.A. 2008. Bacterial Disease. In: Important Infectious and Parasitic Diseases of Farmed Tilapias. Intervet, Schering-Plough Animal Health, New Jersey, USA. p. 24-67.

- Crandall, C.A. and Goodnight, C.J. 1962. Effects of sublethal concentrations of several toxicants on growth of the common guppy, *Lebistes reticulatus*. *Limnol. Oceanogr.* 7(2): 233-239.
- Forbes, B.A., Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. 2007. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 12th ed. Mosby Elsevier Press. St. Louis, Missouri, USA. 1056 p.
- Hoole, D., Bucke, D., Burgess, P. and Wellby, I. 2008. Infectious diseases parasites. In: *Diseases of carp and other cyprinid fishes*. Blackwell science, England. p. 63-124.
- Keremah, R.I. and Inko-Tariah, M.B. 2013. Comparative study of ectoparasites on Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured under integrated and unintegrated pond systems. *Afr. J. Biotechnol.* 12(19): 2711-2714.
- Kim, J.H., Hayward, C.J., Joh, S.J. and Heo, G.J. 2002. Parasitic infections in live freshwater tropical fishes imported to Korea. *Dis. Aquat. Organ.* 52(2): 169-173.
- Klinger, R.E. and Floyd, R.F. 2009. "Introduction to Fresh water Fish Parasites". Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 14 p. [Online]. Available : <http://edis.ifas.ufl.edu/fa041>. Accessed July 17, 2013.
- Komalamisra, C. 1983. Heterophyid metacercariae in fresh water fish from Northeast Thailand: A morphological study. Master Thesis of Science (Tropical Medicine). Mahidol University. 113 p.
- Kreethachat, A. 2005. Characterization of *Rhabdovirus* Isolated from Anchor Fish (*Toxotes chatareus*) Exhibiting Epizootic Ulcerative Syndrome. Master Thesis of Science (Fisheries Science). Kasetsart University. 68 p.
- Kubilay, A., Altun, S., Diler, O. and Ekici, S. 2008. Isolation of *Flavobacterium columnare* from Cultured Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Fry in Turkey. *Turk. J. Fish Aquat. Sci.* 8: 165-169.
- Lightner, D.V., Redman, R., Mohny, L., Dickenson, G. and Fitzsimmons, K. 1988. Major diseases encountered in controlled environment culture of tilapias in fresh- and brackishwater over a three-year period in Arizona. *Proceedings of the 2nd International Symposium on Tilapia in Aquaculture*. Edited by R.S.V. Pullin, T. Bhukawan, K. Tonguthal and J.L. Maclean. International Center for Living and Aquatic Resources Management, Manila, Philippines and the Department of Fisheries, Thailand. p. 111-116.
- Marks, J.E., Lewis, D.H. and Trevino, G.S. 1980. Mixed infection in columnaris disease of fish. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 177(9): 811-814.

- Miyashita, T. 1984. *Pseudomonas fluorescens* and *Edwardsiella tarda* isolated from diseased tilapia. Fish Patho. 19(1): 45-50.
- Mumford, S., Heidel, J., Smith C., Morrison, J., MacConnell, B. and Blazer, V. 2007. Fish Histology and Histopathology. U.S. Fish & Wildlife Service, National Conservation Training Center, West Virginia, USA. 357 p.
- Noga, E.J. 2000. Fish Disease: Diagnosis and Treatment. 1st ed. Iowa State University Press, Ames, USA. 367 p.
- OIE. 2009. Chapter 2.3.9. Viral haemorrhagic septicaemia. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office International Des Epizooties (OIE), Paris, France. p. 279-298.
- OIE. 2012. Chapter 2.3.8. Spring viraemia of carp. In: Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals. Office Internatinal Des Epizooties (OIE), Paris, France. p. 357-373
- Perelberg, A., Ronen, A., Hutoran, M., Smith, Y. and Kotler, M. 2005. Protection of cultured *Cyprinus carpio* against a lethal viral disease by an attenuated virus vaccine. Vaccine. 23(26): 3396-3403.
- Petty, B.D., Francis-Floyd, R. and Yanong, R.P.E. 2012. "Spring Viraemia of Carp". Fisheries and Aquatic Sciences Department, Florida Cooperative Extention Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida. 5 p. [Online]. Available : <http://edis.ifas.ufl.edu/vm106>. Accessed July 10, 2013.
- Pilarski, F., Rossini, A.J. and Ceccarelli, P.S. 2008. Isolation and characterization of *Flavobacterium columnare* (Bernardet et al., 2002) from four tropical fish species in Brazil. Braz. J. Biol. 68(2): 409-414.
- Pikulkaew, S., Meeyam, T. and Banlunara, W. 2009. The Outbreak of Koi Herpesvirus (KHV) in Koi (*Cyprinus carpio koi*) from Chiang Mai Province, Thailand. Thai J. Vet. Med. 39(1): 53-58.
- Plumb, J.A. 1997. Infectious diseases of tilapia. In: Tilapia Aquaculture in the Americas, volume 1. Edited by B. A. Costa-Pierce and J. E. Rakocy. World Aquaculture Society, American Tilapia Association, Baton Rouge, Louisiana, USA. p. 212-228.
- Purivirojkul, W., Areechon, N., Lawhavinit, O. and Purukkiate, C. 2005. Bacterial and Fungal Infection in Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas Chevey*) Hatchery. Kasetsart J. Nat. Sci. 39(5): 57-62.
- Rolland, J. and Egrie, G. 2006. "Viral Hemorrhagic Septicemia in the Great Lakes Region". Animal and Plant Health Inspection Service, United States Department of Agriculture.

- [Online]. Available : <http://www.vet.cornell.edu/microbiology/FishDisease/AquaticProg/documents/Industry.pdf>. Accessed July 7, 2013.
- Sarig, S. and Bejerano, I. 1980. Bactrial stress-caused infections of silver carp and *Sarotherodon aureus* in fish ponds and their control. In: Fish Diseases. Edited by W. Ahne. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, Germany. 224 p.
- Sasaki, K. Suzuki, T. and Saito, Y. 1987. Simplified clean up and gas chromatographic determination of organophosphorus pesticides in crops. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 70(3): 460-464.
- Sato, Y. and Ishikuro, E. 1987. Investigation of the simultaneous determination of organophosphorus pesticides in cereals by capillary gas chromatography. Bullentin of National Fertilizer and Feed Inspection Station, Tokyo. 12: 15-25.
- Sheehan, D. and Hrapchak, B. 1980. Theory and Practice of Histotechnology. 2nd ed. Battelle Press, Columbus, Ohio, USA. 282 p.
- Srisuvan, T., Patchimasiri, T., and Tangdee, S. 2010a. "Development of nested PCR for direct detection and diagnosis of cyprinid herpesvirus 3 infection in carp". Thai-NIAH eJournal. 5(1): 35-42. [Online]. Available : <http://www.dld.go.th/niah>. Accessed July 7, 2013.
- Srisuvan, T., Patchimasiri, T. and Tangdee, S. 2010b. "Differentiation of cyprinid herpesvirus type-3 genotypes collected from Bangkok, Thailand in 2009". Thai-NIAH eJournal. 5(2): 52-58. [Online]. Available : <http://www.dld.go.th/niah>. Accessed July 7, 2013.
- Stahr, H.M. 1991. Arsenic, copper, iron, lead, thallium, and zinc in biological matrices and feed: atomic absorption spectroscopy. In: Analytical methods in toxicology. Edited by H.M. Stahr. John Wiley and Sons Inc., New York, USA. p. 69-73.
- Van Damme, L.R. and Vandepitte, J. 1980. Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Pleisiomonas shigelloides* from healthy Zairese freshwater fish: a possible source of sporadic diarrhea in the tropics. Appl. Environ. Microbiol. 39(3): 475-479.
- Wada, S., Shimamoto, M., Kurata, O., Hatai, K. and Yuasa, K. 2006. Histopathology of artificial infection of koi herpesvirus disease. Proceedings of AZWMP. 2006 October 26-29. Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.
- Wikler, M.A., Cockerill, F.R., Craig, W.A., Dudley, M.N., Eliopoulos, G.M., Hecht, D.W., Hindler, J.F., Low, D.E., Sheehan, D.J., Tenover, F.C., Turnidge, J.D., Weinstein, M.P., Zimmer, B.L., Ferraro, M.J. and Swenson, J.M. 2006. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard. 9th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Pennsylvania, USA. 26(1): 1-28.

Study on hemorrhagic septicemia in freshwater fish

Taweewat Deemagarn* Nopporn Tohmee

National Institute of Animal Health, Department of Livestock Development, Kasetklang, Chatuchak, Bangkok 10900 Thailand

*Corresponding author: Tel: 0-2579-8908; Fax: 0-2579-8919; E-mail: taweewat.d@dld.go.th

Abstract

Hemorrhagic septicemia (HS) in fish is the clinical lesions of hemorrhage and ulceration on the body, which could be caused by bacterial infection (bacterial hemorrhagic septicemia, BHS) or viral infection (viral hemorrhagic septicemia, VHS). In addition, infestation of external parasites could cause wounds on fish skin leading to secondary infections by bacteria and viruses. Because of its high mortality rate, HS is one of the most common disease problems in fish farming industry worldwide causing serious economic lose. The aim of this study was to investigate problems of HS in freshwater fish submitted to the National Institute of Animal Health for disease diagnosis during 2004 and 2011. The results revealed that BHS was found as high as 61.35% (454/740) and VHS was found in 40.60% (108/266). Nine bacterial species were identified including *Aeromonas hydrophilla*, *Aeromonas sobria*, *Edwardsiella tarda*, *Flavobacterium columnare*, *Plesiomonas shigelloides*, *Shewanella putrefaciens*, *Streptococcus agalactiae*, *Vibrio cholera*, and *Vibrio fluvialis*. Koi herpes virus was the only viral pathogen found causing VHS, whereas four species of external parasites were identified including *Dactylogyrus* spp. belonging to Monogenea group and *Epistylis* spp., *Oodinium* spp. and *Trichodina* spp. belonging to Protozoa group. The results of antimicrobial susceptibility test against six different types of antimicrobial agents showed that amoxicillin, gentamicin, ofloxacin and sulfamethoxazole/trimethoprim were still the drugs of choice for the treatment of BHS. However, these drugs should only be used when necessary under veterinary supervision and their appropriate withdrawal periods according to the manufacturer's instructions should be considered in order to avoid antimicrobial resistance and residues in fish, which would be harmful to the consumers.

Keywords : hemorrhagic septicemia, freshwater fish, antimicrobial susceptibility test